

Deteksi Unit-unit CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) pada Genom Beberapa Mikroba yang Berasosiasi dengan Ascidia Laut

(*Detection of CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) Units in Genomes of Some Microbes Associated with Marine Ascidiaceans*)

Trezya N. S. Pangemanan¹⁾, Inneke F. M. Rumengan^{1)*}, Kurniati Kemer¹⁾,
Antonius P. Rumengan¹⁾, Elvy L. Ginting¹⁾, Rosita A. J. Lintang¹⁾, Joudy R. R. Sangari²⁾

¹⁾Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK UNSRAT Manado

²⁾Program Studi Manajemen Sumber Daya Perairan, FPIK UNSRAT Manado

*Email korespondensi: innekerumengan@unsrat.ac.id

ABSTRAK

Sekuens CRISPR merupakan suatu rangkaian nukleotida pada genom banyak mikroba yang terdiri dari urutan-urutan nukleotida palindromik berulang yang mengapit sekuens spesifik yang berasal dari asam nukleat asing. Studi ini bertujuan untuk memperoleh data sekuens genom beberapa mikroba dari komunitas mikrobioma ascidia yang tersedia di NCBI GenBank®, serta mendeteksi keberadaan unit-unit CRISPR pada genom mikroba tersebut dengan analisis *in silico* menggunakan CRISPRCasFinder. Data sekuens genom utuh berhasil diperoleh untuk *Synechococcus* sp. PCC 7002 (3.008,047 MB), *Leptolyngbya* sp. PCC 7376 (5.125,950 MB), *Candidatus endolissoclinum faulkneri* L2 (1.481,191 MB), dan *Prochlorococcus marinus* (1.751,080 MB), juga urutan genom shotgun untuk ketiga strain *Prochloron* didemni (P2-Fiji, P3-Solomon dan P4-Papua New Guinea) masing-masing dengan ukuran 84,370; 40,852; dan 64,281 MB. Sekuens CRISPR terdeteksi pada tiga dari tujuh genom mikroba dengan kisaran 2-20 unit CRPSR. Tipe sistem CRISPR-Cas perlu ditelusuri lebih lanjut ke depan.

Kata kunci: CRISPR; Genom; Mikroba laut; CRISPRCasFinder

ABSTRACT

CRISPR sequence is a series of nucleotides that is found in the genome of many microorganisms. It consists of repeating palindromic nucleotide sequences that flank specific spacer sequences derived from foreign nucleic acid. This study aims to obtain genome sequence data of several microbes from the ascidia microbiome community available in the NCBI GenBank® and to detect the presence of CRISPR units by *in silico* analysis using CRISPRCasFinder. Whole genomic sequence data were successfully obtained for *Synechococcus* sp. PCC 7002, (3.008,047 MB) *Leptolyngbya* sp. PCC 7376 (5.125,950 MB), *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* L2 (1.481,191 MB) and *Prochlorococcus marinus* (1.751,080 MB), and the whole genome shotgun (WGS) sequences for three strains of *Prochloron* didemni (P2-Fiji, P3-Solomon and P4-Papua New Guinea) with the size of 84,370, 40,852 and 64,281 MB, respectively. CRISPR sequences were detected in three of seven genomes with the range of 2 to 20 CRISPR units. The types of CRISPR-Cas system would be necessary to ascertain in future.

Keywords: CRISPR; Genome; Marine Microbes; CRISPRCasFinder

PENDAHULUAN

Dinamika laut yang kompleks memicu mikroba untuk bertahan hidup dengan bentuk adaptasi yang unik dan beragam, salah satunya dengan hidup berasosiasi dengan avertebrata laut seperti ascidia hingga membentuk suatu mikrobioma. Mikrobioma merupakan sekumpulan mikroorganisme yang menempati suatu lingkungan tertentu, termasuk satu bagian dari tubuh makroorganisme (Stal dan Cretoiu, 2022). Ascidia atau *sea squirts* merupakan avertebrata laut dari golongan kelas dari subfilum Tunikata. Mikrobioma ascidia yang dimaksudkan adalah komunitas mikroorganisme yang ditemui berasosiasi dengan ascidia. Beberapa spesimen mikroba dari mikrobioma ascidia merupakan objek riset yang banyak diminati oleh pakar terkait antara lain Schreiber *et al.* (2016) dan Chen *et al.* (2018),

karena memproduksi senyawa-senyawa bioaktif. Salah satu di antaranya adalah mikroba fotosimbion, *Prochloron didemni* yang dilaporkan Rumengan *et al.* (2021) memiliki klaster gen *patE* yang menyandi senyawa peptida siklik dengan kemampuan sebagai anti kanker. Mikroba lain yang pernah ditemukan berasosiasi dengan ascidia laut di Teluk Manado antara lain *Synechococcus* sp. dan *Leptolyngbya* sp. (Untu *et al.*, 2015).

Potensi molekuler mikroba laut yang terekam dalam genom tidak hanya kemampuan memproduksi senyawa bioaktif, tetapi juga kemampuan untuk mempertahankan diri terhadap infeksi asam nukleat asing, seperti virus dan plasmid. Mikroba demikian umumnya berupa bakteri dan arkea yang memiliki sekuens genom unik, karena pada lokasi-lokasi tertentu terdapat rangkaian nukleotida yang dikenal sebagai CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*). Satu unit CRISPR merupakan suatu rangkaian nukleotida pada lokus tertentu di genom suatu mikroba yang terdiri dari urutan-urutan nukleotida palindromik berulang (*repeats*) yang mengapit urutan-urutan yang diintegrasikan (*spacers*) dari urutan asam nukleat asing yang pernah menginfeksi mikroba tersebut (Mojica & Garrett, 2013; Makarova *et al.*, 2015; Rumengan, 2021; Barrangou *et al.*, 2022). Sekuens CRISPR sering ditemukan berasosiasi (*tandem*) dengan gen-gen *cas* (*CRISPR associated*) termasuk gen-gen penyandi protein yang dapat memotong nukleotida (nuklease), sehingga sistem ini dikenal sebagai CRISPR-Cas (Knott & Doudna, 2018). Sistem CRISPR-Cas terdapat secara unik dengan tipe-tipe yang berbeda menurut jenis mikroba.

Unit-unit CRISPR pada mikroba laut perairan tropis masih belum banyak dijajaki, termasuk untuk mikroba yang berasosiasi dengan ascidia. Padahal pendeteksian CRISPR secara *in silico*, akan membuka peluang pemrograman perangkat CRISPR-Cas untuk penyuntingan gen yang dapat diaplikasikan antara lain untuk pengembangan biota laut yang unggul dan resisten terhadap penyakit, serta untuk konservasi sumberdaya laut (Nymark *et al.*, 2016; Cleves *et al.*, 2018; Okoli *et al.*, 2021). Penelitian sebelumnya terkait mikroba yang berasosiasi dengan ascidia dari Teluk Manado Sulawesi Utara yang dilaporkan oleh Rumengan *et al.* (2021) menyangkut karakterisasi gen yang menyandi senyawa peptida siklik dan analisis *in silico* dengan penambahan molekul patelamida dan *ulythiacyclamide*, patut ditindaklanjuti dengan penelusuran urutan-urutan nukleotida tertentu yang dikenal sebagai CRISPR yang bisa dikembangkan sebagai perangkat penyuntingan genom. Dengan demikian, penelitian ini membuka wawasan potensi genomik mikroba yang berasosiasi dengan ascidia laut yang belum pernah dilaporkan sebelumnya.

Studi ini bertujuan untuk memperoleh data sekuens genom beberapa mikroba termasuk komunitas mikrobioma ascidia yang tersedia dalam *database* sekuens genetik NCBI GenBank® dan mendeteksi keberadaan unit-unit CRISPR dengan pendekatan analisis *in silico* menggunakan perangkat lunak CRISPRFinder.

METODE

Studi ini menggunakan metode *in silico* untuk mendeteksi unit-unit CRISPR pada sekuens genom spesies mikroba laut yang pernah ditemukan di Sulawesi Utara, seperti *Synechococcus* sp., *Leptolyngbya* sp., dan *Prochloron didemni* (Untu *et al.*, 2015; Rumengan *et al.*, 2021). Sebagai pembanding digunakan pula *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* dan *Prochlorococcus marinus* yang

genomnya telah tersedia pada basis data genetik NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) juga diunduh untuk pendeteksian unit CRISPR. Perangkat yang digunakan berupa laptop Asus dengan spesifikasi Processor Intel® N4000 CPU @1.10 GHz dan RAM 4.00 GB, hardisk eksternal dan CRISPRCasFinder *web server*.

Sekuens genomik mikroba target diperoleh dari basis data NCBI GenBank® melalui laman [GenBank Overview \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Sekuens mikroba kemudian diunduh dari GenBank® dalam format fasta, masing-masing spesies dengan accession number dan memperoleh ukuran genom yang berbeda. Selanjutnya, CRISPRCasFinder dalam bentuk *web server* diakses melalui laman CRISPR-Cas++ (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>) (Couvin *et al.*, 2018). Sekuens mikroba diinput dengan mengunggah file fasta yang dilanjutkan dengan mengatur parameter terkait karakteristik unit CRISPR pada menu “*CRISPR Advanced Settings*”. Tahapan ini merupakan hal yang krusial dalam prosedur pendeteksian unit-unit CRISPR, di mana salah satu parameter kunci tahap ini adalah menetapkan panjang minimal dan maksimal dari *repeat*, yaitu 18 dan 52 nukleotida (Alkhnbashi *et al.*, 2021). Selanjutnya, pendeteksian unit CRISPR dijalankan dengan mengklik “Run CRISPRCasFinder” yang secara otomatis mendeteksi jumlah unit CRISPR yang terdapat pada sekuens genom mikroba yang diunggah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lebih dari 30 genera mikroba telah dilaporkan berasosiasi dengan ascidia, dengan berbagai potensi molekuler yang dimilikinya. Beberapa mikroba potensial yaitu *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Leptolyngbya* sp. PCC 7376, *P. didemni* P2-Fiji, *P. didemni* P3-Solomon, *P. didemni* P4-Papua New Guinea dan *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* L2 sebagai komunitas mikrobioma ascidia ditemukan berasosiasi dengan beberapa jenis ascidia terutama dari famili Didemnidae, baik sebagai mikroba simbion maupun fotosimbion (Untu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018; Youssef *et al.*, 2020).

Hasil analisis *in silico* untuk deteksi CRISPR yang diawali dengan pelacakan data sekuens genom dari NCBI GenBank® dapat dilihat pada Tabel 1, dimana terdapat 7 spesies mikroba yang berhasil dilacak sekuens genomnya, dengan ukuran genom yang berkisar antara 40,852 hingga 5.125,950 MB. Ternyata tidak semua dari sekuens yang tersedia merupakan genom yang utuh dari mikroba terkait. Genom tiga strain *P. didemni* yaitu Fiji, Solomon, dan Papua Nugini, tersedia dalam bentuk WGS (*whole genom shotgun*) yang ukurannya memang jauh lebih kecil dibandingkan dengan ukuran sekuens genom utuh mikroba lain. Ukuran WGS yang diperoleh juga sangat berbeda, padahal dari spesies yang sama. Rupanya sekuens genom utuh dari *P. didemni* belum didepositkan di basis data genetik NCBI, atau memang belum pernah dilakukan.

Penelusuran sekuens pada mikroba *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* L2 yang juga termasuk komunitas mikrobioma ascidia diperoleh ukuran genom yang lebih besar dari WGS mikroba fotosimbion, dan dapat dibandingkan dengan ukuran genom *P. marinus* yang bukan mikroba simbion. *P. marinus* merupakan mikroba fotosintetik bersel satu ($\leq 2 \mu\text{m}$) yang diketahui memiliki peran signifikan dalam produksi primer perairan karena jumlahnya yang melimpah di perairan laut (Flombaum *et al.*, 2013). Mikroba ini dijadikan sebagai spesies mikroba pembanding, karena secara filogenetik, *Prochlorococcus* membentuk kelompok

monofiletik dengan *Synechococcus*, namun tidak dengan *P. didemni* yang termasuk dalam genus yang memiliki klorofil a/b (Lindell, 2014). Selain itu, *P. didemni* ditemukan sebagai mikroba simbiosis, sedangkan *Prochlorococcus* merupakan mikroba yang bebas dan tersebar luas di perairan.

Tabel 1. Tabulasi data sekuens genom mikroba yang diperoleh dari NCBI GenBank®

Spesies Mikroba	Nomor Akses	Jenis Asosiasi	Ukuran Genom (MB)	Ket.
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	CP000951.1	Mikroba simbiosis	3.008,047	Complete genom
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376	CP00a3946.1	Mikroba simbiosis	5.125,950	Complete genom
<i>P. didemni</i> P2-Fiji	JH605241.1	Mikroba fotosimbiosis	84,370	WGS*
<i>P. didemni</i> P3-Solomon	JH608502.1	Mikroba fotosimbiosis	40,852	WGS*
<i>P. didemni</i> P4-Papua New Guinea	JH610785.1	Mikroba fotosimbiosis	64,281	WGS*
<i>Candidatus Endolissoclinum faulkneri</i> L2	CP003539.1	Mikroba simbiosis	1.481,191	Complete genome
<i>Prochlorococcus marinus</i>	AE017126.1	Free-living	1.751,080	Complete genome

*Whole Genome Shotgun

Seperti yang diperlihatkan pada Tabel 1, sebagian besar mikroba berasal dari filum Sianobakteri. *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 merupakan mikroba yang memiliki kemampuan untuk beradaptasi dengan kadar salinitas yang tinggi pada perairan (*euryhaline*) serta dapat menoleransi iradiasi cahaya yang tinggi (Ludwig & Bryant, 2012). *Leptolyngbya* sp. strain PCC 7376 termasuk dalam genus *Leptolyngbya*, yaitu kelompok sianobakteri yang memiliki filamen (Walter et al., 2017). Mikroba ini dapat ditemukan pada habitat yang beragam, termasuk lingkungan bersuhu tinggi. Kedua mikroba tersebut ditemukan berasosiasi dengan ascidia jenis *L. patella* yang berasal dari perairan Teluk Manado, Sulawesi Utara (Untu et al., 2015).

P. didemni merupakan mikroba fotosimbiosis yang ditemukan berasosiasi dengan jenis ascidia berasal dari famili Didemnidae, yaitu *Didemnum*, *Trididemnum*, *Lissoclinum*, dan *Diplosoma*. *P. didemni* memiliki struktur sel dan komposisi biokimia yang mirip dengan sianobakteria tetapi, mikroba ini memiliki pigmen fotosintetik berupa klorofil a dan klorofil b yang mirip dengan alga hijau yang membuatnya unik dan berbeda dari sianobakteria lainnya. (Donia et al., 2011; Kuhl et al. 2012; dan Rumengan et al., 2021). Pelacakan genom dari GenBank® berhasil memperoleh data sekuens WGS *P. didemni* dari 3 strain yang berbeda. Selain itu, dari kedelapan spesies tersebut, hanya satu spesies yang diketahui berasal dari filum Proteobakteri, yaitu *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* L2. Mikroba ini dilaporkan sebagai produsen senyawa *patellazole* dalam simbiosisnya dengan *L. patella* (Kwan et al., 2012).

Tujuh sekuens genom mikroba yang diperoleh digunakan dalam pendeteksian unit-unit CRISPR menggunakan CRISPRCasFinder. CRISPRCasFinder mengidentifikasi unit CRISPR dengan menggunakan CRISPRFinder V4.2 yang berbasis pada Vmatch versi 2.3 yang mendeteksi urutan palindromik berulang pada sekuens (Couvin *et al.*, 2018). Oleh sebab itu, pendeteksian ini menggunakan paramater kunci yang dipilih yaitu dengan mengatur panjang minimal dan maksimal urutan palindrom berulang (*repeat*) masing-masing 18 dan 52 nukleotida serta rentang panjang urutan *spacer* yang berkisar antara 20 - 50 nukleotida (Alkhnabashi *et al.*, 2021). Dari ketujuh sekuens genom mikroba, ternyata hanya 3 sekuens mikroba yang terdeteksi memiliki unit CRISPR, dengan jumlah yang bervariasi antara 2 – 20 unit untuk masing-masing mikroba (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil deteksi unit-unit CRISPR menggunakan CRISPRCasFinder

Spesies Mikroba	Nomor Akses	Ukuran Genom (MB)	Jumlah unit CRISPR	Jumlah Spacer	Derajat Evidence
<i>Synechococcus sp.</i> PCC 7002	CP000951.1	3.008,047	5	17	1-4
<i>Leptolyngbya sp.</i> PCC 7376	CP003946.1	5.125,950	20	36	1-2
<i>P. didemni</i> P2-Fiji	JH605241.1	84,370	2	2	1

Perbedaan jumlah unit yang terdeteksi ditentukan oleh keberadaan *repeat* dan *spacer* pada genom masing-masing mikroba yang diunggah sekuensnya, di mana panjang *repeat* ditemukan bervariasi tergantung dari sistem CRISPR (Barrangou *et al.*, 2022). Unit CRISPR terbanyak terdeteksi pada *Leptolyngbya sp.* PCC 7376 yang memiliki 20 unit CRISPR dengan 36 *spacers*, yang diikuti dengan *Synechococcus sp.* PCC 7002 yang memiliki 5 unit CRISPR dengan 17 *spacers*.

Hasil analisis genomik dari pendeteksian CRISPR pada *Synechococcus sp.* PCC 7002 menunjukkan derajat *evidence* yang lebih tinggi, terutama untuk lokus CRISPR yang ketiga dibandingkan dengan *Leptolyngbya sp.* Derajat *evidence* ini dihasilkan dari algoritma CRISPRCasFinder, dimana penentuan algoritmanya dilakukan berdasarkan gabungan derajat similiaritas dari urutan *repeats* dan *spacers* yang terdeteksi. Pada umumnya, urutan *repeats* terkonservasi dengan baik pada satu unit CRISPR, walaupun memiliki panjang berbeda antar satu unit dengan unit lainnya. Sedangkan urutan *spacers* tidak selalu terkonservasi sehingga panjangnya bisa ditemukan selalu bervariasi. Oleh sebab itu, semakin similiar panjang urutan *repeats* dan *spacers* yang terdeteksi, maka derajat *evidence* akan semakin tinggi (Couvin *et al.*, 2018). Sementara itu, *P. didemni* terdeteksi memiliki derajat *evidence* 1 karena CRISPRCasFinder hanya menemukan kandidat unit CRISPR dengan *spacers* yang berjumlah kurang dari tiga pada masing-masing sekuens. Namun, tidak menutup kemungkinan terdeteksinya unit-unit CRISPR dengan derajat *evidence* yang lebih tinggi jika sekuens genom utuh dari mikroba terkait telah tersedia pada GenBank®.

KESIMPULAN

Berdasarkan pelacakan data sekuens genom dari NCBI GenBank® diperoleh ukuran genom yang berbeda-beda, *Synechococcus sp.* PCC 7002, *Leptolyngbya sp.* PCC 7376, *P. didemni* P2-Fiji, *P. didemni* P3-Solomon, *P. didemni* P4-Papua New Guinea dan *Candidatus Endolissoclinum faulkneri* L2, serta *P. marinus* dengan

ukuran sekuens genom berkisar antara 40,852 hingga 5.125,950 MB. Lebih lanjut, hasil pendeteksian CRISPR menunjukkan keberadaan unit-unit CRISPR pada 3 dari 7 genom mikroba yang dideteksi, yaitu *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Leptolyngbya* sp. PCC 7376, *P. didemni* P2-Fiji, masing-masing dengan jumlah 5, 20 dan 2 unit CRISPR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Studi ini merupakan bagian dari lingkup penelitian skim R_MAPALUS yang didanai oleh PNBPU Universitas Sam Ratulangi. Untuk itu disampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada Rektor dan pimpinan Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) UNSRAT yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alkhnabashi, O. S., Mitrofanov, A., Bonidia, R., Raden, M., Tran, V., Eggenhofer, F., Shah, S., Öztürk, E., Padilha, V., Sanches, D., De Carvalho, A., & Backofen, R. (2021). CRISPRloci: comprehensive and accurate annotation of CRISPR–cas systems. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W125-W130.
- Barrangou, R., Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2022). CRISPR-cas systems: Core features and common mechanisms. Dalam R. Barrangou., E.J. Sontheimer., & L.A. Marraffini. *CRISPR Biology and Applications*, 1-12. ASM Press.
- Chen, L., Hu, J., Xu, J., Shao, C., & Wang, G. (2018). Biological and chemical diversity of ascidian-associated microorganisms. *Marine Drugs*, 16(10), 362.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E. P., Vergnaud, G., Gautheret, D., & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for cas proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W246-W251.
- Donia, M. S., Fricke, W. F., Ravel, J., & Schmidt, E. W. (2011). Variation in tropical reef symbiont Metagenomes defined by secondary metabolism. *PLoS ONE*, 6(3), e17897.
- Flombaum, P., Gallegos, J. L., Gordillo, R. A., Rincón, J., Zabala, L. L., Jiao, N., Karl, D. M., Li, W. K., Lomas, M. W., Veneziano, D., Vera, C. S., Vrugt, J. A., & Martiny, A. C. (2013). Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9824-9829.
- Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 361(6405), 866-869.
- Kühl, M., Behrendt, L., Trampe, E., Qvortrup, K., Schreiber, U., Borisov, S. M., Klimant, I., & Larkum, A. W. (2012). Microenvironmental ecology of the chlorophyll B-containing symbiotic Cyanobacterium *Prochloron* in the Didemnid ascidian *Lissoclinum patella*. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Kwan, J. C., Donia, M. S., Han, A. W., Hirose, E., Haygood, M. G., & Schmidt, E. W. (2012). Genome streamlining and chemical defense in a

- coral reef symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20655-20660.
- Lindell, D. (2014). The genus *Prochlorococcus*, phylum Cyanobacteria. *The Prokaryotes*, 829-845.
- Ludwig, M., & Bryant, D. A. (2012). *Synechococcus* Sp. Strain PCC 7002 Transcriptome: Acclimation to temperature, salinity, oxidative stress, and mixotrophic growth conditions. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *Methods in Molecular Biology*, 47-75.
- Mojica, F. J., & Garrett, R. A. (2012). Discovery and seminal developments in the CRISPR Field. *CRISPR-Cas Systems*, 1-31.
- Okoli, A. S., Blix, T., Myhr, A. I., Xu, W., & Xu, X. (2021). Sustainable use of CRISPR/Cas in fish aquaculture: The biosafety perspective. *Transgenic Research*, 31(1), 1-21.
- Rumengan IFM. (2021). Mikroba Laut sebagai penyedia perangkat penyuntingan genom. Dalam *Pengelolaan Sumberdaya Laut Berkelanjutan. Book Chapter*, 1-20. Unsrat Press.
- Rumengan, I. F., Roring, V. I., Haedar, J. R., Siby, M. S., Luntungan, A. H., Kolondam, B. J., Uria, A. R., & Wakimoto, T. (2021). Ascidian-associated photosymbionts from Manado, Indonesia: Secondary metabolites, bioactivity simulation, and biosynthetic insight. *Symbiosis*, 84(1), 71-82.
- Schreiber, L., Kjeldsen, K. U., Funch, P., Jensen, J., Obst, M., López-Legentil, S., & Schramm, A. (2016). Endozoicomonas are specific, facultative symbionts of sea squirts. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Stal, L.J., & Cretoiu, M.S. (2022). The marine microbiome, Edisi ke-2. *The Microbiomes of Humans, Animals, Plants, and the Environment*, Springer.
- Untu, P., Rumengan, I. F., & Ginting, E. L. (2015). Identifikasi Mikroba Yang Koeksis Dengan ascidia *Lissoclinum patella* Menggunakan Sekuens Gen 16S rRNA. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 3(2), 23.
- Walter, J. M., Coutinho, F. H., Dutilh, B. E., Swings, J., Thompson, F. L., & Thompson, C. C. (2017). Ecogenomics and taxonomy of Cyanobacteria phylum. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Youssef, D. T., Almagthali, H., Shaala, L. A., & Schmidt, E. W. (2020). Secondary metabolites of the genus *Didemnum*: A comprehensive review of chemical diversity and pharmacological properties. *Marine Drugs*, 18(6), 307.